

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 748 476

②1 N° d'enregistrement national : **96 05692**

⑤1 Int Cl⁶ : C 07 K 14/195, C 07 K 14/24, 14/255, C 07 H 3/06,
A 61 K 39/02, 39/108

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 07.05.96.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 14.11.97 Bulletin 97/46.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *PIERRE FABRE MEDICAMENT —
FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *BINZ HANS, HAEUW JEAN
FRANCOIS et SVENSON STEFAN.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : *REGIMBEAU.*

⑤4 COMPLEXE IMMUNOGENE, SON UTILISATION, SON PROCEDE DE PREPARATION ET VACCIN LE
CONTENANT.

⑤7 La présente invention concerne un complexe immuno-
gène, caractérisé en ce qu'il consiste en au moins un épi-
topé oligo- ou polysaccharidique naturellement présent
dans des bactéries, couplé à une protéine porteuse choisie
parmi la protéine de liaison à la sérumalbumine humaine
du Streptocoque, les protéines de membrane externe de
bactérie gram négatif, ou leurs fragments.

L'invention concerne également des vaccins comprenant
un tel complexe immunogène, et procédé de préparation
de ce complexe.

FR 2 748 476 - A1



La présente invention concerne de nouveaux complexes immunogènes comprenant un dérivé saccharidique, utiles notamment comme médicaments et en particulier comme vaccins.

5 Protéines et polysaccharides sont les deux principaux types d'antigènes de surface rencontrés chez les bactéries et les champignons et sont par leur caractère antigénique d'excellents outils pouvant entrer dans la conception de vaccins. Toutefois la mise au point de vaccins définis dépourvus d'effets secondaires nécessite l'emploi d'antigènes vaccinants de faible masse moléculaire, principalement des peptides ou des
10 oligosaccharides. Ces antigènes, mais aussi d'autres de masse moléculaire supérieure tels que les polysaccharides, ne peuvent induire seuls une réponse immunitaire qui soit intense et durable.

Le potentiel des polysaccharides bactériens dans la préparation de vaccins est apparu dès le début du XXème siècle. Ces composés jouent en effet un rôle important dans la structure et le pouvoir pathogène de
15 certaines bactéries Gram positives et négatives. Deux types de polysaccharides bactériens sont d'excellents candidats à titre d'agent vaccinal. Il s'agit des polysaccharides issus de la capsule bactérienne et des polysaccharides issus des lipopolysaccharides (LPS) de la membrane
20 externe des bactéries Gram négatives.

Ce sont des polymères composés essentiellement d'une partie glucidique, et dont une partie de la molécule est exposée à la surface de la bactérie. Ils sont constitués d'un enchainement linéaire d'unités répétitives, caractéristiques d'une espèce bactérienne donnée, dont le
25 nombre peut varier de une à plusieurs centaines, expliquant ainsi leur poids moléculaire parfois très élevé. Chaque unité répétitive est constituée elle-même de plusieurs monosaccharides reliés entre eux par des liaisons glycosidiques, généralement de 1 à 7 résidus monosaccharidiques. Ces derniers peuvent se voir plus ou moins substitués par des groupements
30 minéraux tels que des phosphates ou par des groupes organiques, tels que des acides, des amines, des alcools, des acides gras ou des acides aminés.

Le caractère répétitif des épitopes des polysaccharides bactériens (petit nombre d'épitopes différents), qu'il s'agisse de polysaccharides isolés de la capsule bactérienne ou de lipopolysaccharides de la membrane externe des bactéries Gram négatives, en fait en effet des immunogènes T-indépendants. Cela se traduit par l'absence de réponse immunitaire à ces antigènes chez le jeune enfant et par l'absence de mémoire immunitaire chez l'adulte (pas de réponse immunitaire de type cellulaire, peu ou pas d'effet de rappel, réponse anticorps restreinte à la classe des IgM).

Des vaccins comprenant un extrait polysaccharidique se sont révélés relativement efficaces chez l'adulte à faible dose, 25 à 50 µg. Parmi les vaccins à base de polysaccharides bactériens, on compte à ce jour des vaccins contre les infections

- à *Neisseria meningitidis* : vaccin tétravalent contre les souches des groupes A, C, W135 et Y,
- à *Streptococcus pneumoniae* : vaccin pneumococcique multivalent associant 23 sérotypes de polysaccharides capsulaires,
- à *Salmonella typhi* : vaccin composé du polysaccharide capsulaire de *S. typhi*. Toutefois ces vaccins sont particulièrement inefficaces chez les jeunes enfants.

D'autres approches ont été testées dans la stratégie vaccinale contre les infections à *Salmonella*. En effet, les bactéries du genre *Salmonella* sont des entérobactéries virulentes à tropisme digestif, pathogènes pour l'homme et pour de nombreux animaux vertébrés. Le genre *Salmonella* est classiquement constitué de plus de 2000 sérotypes différents. Les principales pathologies induites par ces bactéries sont (pour des revues générales voir: Le Minor, L., 1987, *Salmonella* dans Bactériologie Médicale, L. Le Minor et M. Véron Eds., Médecine-Sciences Flammarion Paris, p. 411-427, Pegues, D.A. and Miller, S.I., 1994, *Salmonellosis including typhoid fever*, Curr. Opin. Infect Dis. 7, 616-623):

- chez l'animal, des toxi-infections:
 - . spécifiques de certaines espèces, *Salmonella abortus-ovis* chez les ovins, *Salmonella galinarum* chez les volailles,
 - . non spécifiques provoquées par les sérotypes dits "ubiquitaires" (*Salmonella Typhimurium*, *enteritidis*,...),

- chez l'homme:

. les fièvres typhoïdes (*Salmonella typhi*) et les fièvres paratyphoïdes (*Salmonella paratyphi* A, B et D),

5 . les toxi-infections alimentaires, pour lesquelles les sérotypes les plus fréquemment incriminés sont *Salmonella typhimurium*, *enteritidis* et *panama*.

10 Actuellement trois types de vaccins anti-typhoïdiques sont disponibles sur le marché (pour des revues générales voir : Levine, M.M., Hone, D.M., Stocker, B.A.D. et Cadoz, M., 1990, New and improved vaccines against typhoid fever dans New Generation Vaccines, G.C. Woodrow and M.M. Levine Eds, Marcel Dekker Inc. New York and Basel, p. 269-287, Jalla, A.G.S., Sazawal, S. et Bhan, M.K., 1994, Advances in vaccines for typhoid fever, Indian J. Pediatr. 61 321-329):

15 - Les vaccins inactivés

20 Les formes injectables de type "vaccin bactérien inactivé" sont les formes vaccinales les plus anciennes. Il s'agit de vaccins pouvant contenir 500 à 1000 millions de bactéries par dose, sous forme liquide. Les bactéries sont inactivées par des traitements par la chaleur et/ou par des composés chimiques tels que l'acétone, le formol ou le phénol. Selon les sérotypes bactériens qu'ils contiennent, on distingue

25 - les vaccins anti-typhoïdiques: on trouve dans cette classe les spécialités "Typhoid vaccine" de la Société WYETH-AYERST aux Etats-Unis, ou "Typhoid monovalent" de la Société WELLCOME au Royaume Uni,

- les vaccins anti-typho/paratyphoïdiques: on recense dans cette seconde classe les vaccins "Vac TAB" de PASTEUR en France ou "Typhidral" de BIOCINE SCLAVO en Italie.

30 En France, le vaccin TAB (PASTEUR) est un vaccin bactérien inactivé complet liquide trivalent, associant *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A et B. Son efficacité relative est en fait limitée à la valence T. Ce vaccin est réactogène: il provoque dans un tiers des cas des réactions locales et générales précoces. Il est injecté par voie sous-cutanée, à raison

de 2 à 3 injections, à 2 à 4 semaines d'intervalle, suivies d'un rappel. En France la réglementation actuelle qui l'impose encore à certaines catégories professionnelles, dont les professions militaires et de santé, n'est en fait plus justifiée. En milieu militaire, on utilise maintenant un

5 vaccin monovalent T, non commercialisé.

L'immunisation des enfants de moins de un an n'est en général pas recommandée à cause des effets indésirables pouvant survenir après l'injection (fortes douleurs et fièvre importante).

10 - Un vaccin vivant atténué.

Le vaccin typhoïdique oral Ty21a ("Vivotif", BERNA) contient une souche vivante défective de Salmonella typhi, dépourvue de galactose-4-épimérase. Son administration est orale, sous la forme de capsules

15 gastrorésistantes contenant 1 à 8.10^9 bactéries vivantes sous forme lyophilisée. Le schéma vaccinal comporte 3 doses successives aux jours 1, 3 et 5, avec prises simultanées de bicarbonate de soude pour neutraliser l'acidité gastrique. Evaluée dans des zones d'endémie en Egypte et au Chili, la valeur protectrice serait comprise entre 60 et 90%. Il n'y aurait pas

20 d'effets indésirables. La protection vaccinale devient effective environ 10 jours après la dernière dose. La protection est valable pour une période pouvant aller de 1 à 7 ans, et il est ainsi recommandé aux voyageurs à destination de régions endémiques de répéter la vaccination annuellement.

25 Des formes orales plus anciennes sont encore disponibles. Il s'agit de vaccins inactivés dont l'efficacité n'a toutefois pas été clairement établie ("Taboral" de la Société BERNA, "Enterovaccino" en Italie).

- Un vaccin de type sous-unitaire.

30

Le vaccin "Typhim Vi" de l'Institut MERIEUX est préparé à partir de polyoside capsulaire Vi purifié de *Salmonella typhi*. Il s'agit d'une solution injectable contenant 25 µg de polysaccharide. Une seule injection, sous-cutanée ou intramusculaire, assure une protection uniquement contre le risque infectieux lié à *Salmonella typhi* chez les adultes et les enfants de plus de 5 ans. Ce vaccin ne confère pas de protection vis-à-vis des *Salmonella paratyphi* A et B, ces sérotypes n'étant pas encapsulés. L'immunité apparaît environ 15 jours à 3 semaines après l'injection. La durée de la protection est au moins égale à 3 ans. Dans les territoires à forte endémie, le taux de protection observé est aux alentours de 60%.

Aucune de ces spécialités n'est suffisamment efficace dans le traitement et la prévention de la fièvre typhoïde. La durée de la protection est souvent limitée. La vaccination des enfants est difficile et celle des nourrissons impossible. Les vaccins inactivés ne peuvent en aucun cas être prescrits chez l'enfant et le nourrisson et les deux dernières formes vaccinales ne peuvent quant à elles être utilisées chez le nourrisson et l'enfant en bas âge. Le vaccin oral Ty21a n'est en effet pas recommandé chez l'enfant de moins de 6 ans et le vaccin polysaccharidique "Typhim Vi" ne peut être injecté chez l'enfant de moins de 18 mois.

Afin d'éviter ces inconvénients, il serait souhaitable de pouvoir disposer de complexes immunogènes capables de conférer une bonne immunité contre les souches pathogènes, en entraînant une réponse immunitaire à la fois de type humoral et cellulaire, chez l'enfant et le nourrisson, l'induction d'un effet mémoire, et provoquant peu d'effets secondaires.

Ces buts, et d'autres qui apparaîtront par la suite, peuvent être atteints grâce à des complexes immunogènes, caractérisés en ce qu'ils consistent en au moins un épitope oligo- ou polysaccharidique naturellement présent dans des agents pathogènes tels que les bactéries, couplé à une protéine porteuse choisie parmi la protéine de liaison à la sérumalbumine humaine du *Streptocoque*, les protéines de membrane externe de bactérie gram négatif, ou leurs fragments. En effet le couplage par une liaison covalente de l'oligosaccharide ou du polysaccharide transforme ces derniers en immunogène T dépendants.

L'épitope oligo- ou polysaccharidique est susceptible d'être obtenu à partir de bactéries, gram négatif ou gram positif, et en particulier à partir de lipopolysaccharides de membrane ou des oligosaccharides de capsule, de bactéries du genre *Salmonella*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Shigella*,
5 *Haemophilus* ou *Klebsiella*.

Selon un aspect préféré de l'invention, l'agent pathogène peut être *Salmonella typhi*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* ou *Streptococcus pneumoniae*.

10 L'épitope oligo- ou polysaccharidique peut également être obtenu à partir d'un champignon, en particulier appartenant à l'un des genres *Candida*, *Cryptococcus* ou *Lipomyces*.

Les polysaccharides issus de lipopolysaccharides sont préparés par extraction des LPS de la membrane puis élimination du lipide A par hydrolyse ménagée. Les polysaccharides capsulaires sont quant à eux plus
15 facilement isolés de la suspension bactérienne : un chauffage à 100° C pendant une dizaine de minutes (solubilisation) suivi d'une centrifugation permet d'isoler le polysaccharide capsulaire Vi de *Salmonella typhi*. Les deux types de polysaccharides peuvent ensuite être purifiés par chromatographie et/ou par filtration sur membrane.

20 L'utilisation de polysaccharides "entiers" dans un procédé de couplage peut voir apparaître certains problèmes techniques dus principalement à la taille trop importante de ces composés : formation d'un gel, précipitation.

25 Afin de surmonter ce problème différentes méthodes de clivage du polysaccharide peuvent être utilisées : fragmentation aux ultra-sons, dépolymérisation par oxydo-réduction, hydrolyses ménagées en milieu acide ou basique, hydrolyse enzymatique.

La méthode de fragmentation permettant la libération d'oligosaccharides doit être adaptée au polysaccharide étudié. Un
30 oligosaccharide est un composé, pouvant dériver d'un polysaccharide, et qui présente par rapport au polysaccharide de départ un nombre réduit d'unités de répétition osidiques.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence que le couplage par liaison covalente de l'oligosaccharide ou du polysaccharide avec une protéine porteuse telle que définie précédemment permettait de résoudre les problèmes posés par l'utilisation de dérivés polysaccharidiques seuls, ou couplés à d'autres porteurs.

Par exemple, le seul vaccin conjugué sur le marché est un vaccin destiné à prévenir chez l'homme les infections invasives à *Haemophilus influenzae* de type b (méningites). Pour les quatre spécialités commercialisées, l'antigène vaccinant conjugué est un oligosaccharide ou un polysaccharide isolé de la capsule : le PRP, polyribosyl ribitol phosphate.

Les protéines porteuses utilisées dans la conception de ce vaccin conjugué sont de deux types :

- Les anatoxines tétanique (TT) et diphtérique (DT),
- un extrait de protéines membranaires de *Neisseria meningitidis*, l'OMPC.

Les anatoxines tétanique et diphtérique sont actuellement les protéines porteuses les mieux caractérisées, tant d'un point de vue structural que biologique (propriétés vaccinales, propriétés de protéines porteuses), et sont pour ces raisons considérées comme les protéines porteuses de référence.

Ces protéines sont utilisées dans le cadre des vaccinations antitétanique et antidiphtérique. Les vaccins correspondants sont très efficaces (protection proche de 100% dans les deux cas) et bien tolérés.

Ce sont des exotoxines bactériennes qui peuvent être extraites et purifiées d'un filtrat de culture : *Clostridium tetani* pour TT et *Corynebacterium diphtheria* pour DT. La toxine TT est une protéine de 150kDa. La toxine DT possède une masse moléculaire inférieure et est sécrétée sous forme d'une simple chaîne polypeptidique de 535 acides aminés. Après purification, ces protéines sont inactivées par la chaleur et le formol. Elles peuvent être combinées entre elles (vaccin DT), et avec de nombreux autres vaccins (coqueluche, poliomyélite...). Thermorésistantes, elles se conservent à +4°C pendant quelques années, mais ne doivent pas être congelées.

L'emploi trop fréquent de ces protéines (vaccination antiténique et antidiphthérique, vaccins conjugués) peut toutefois aller à l'encontre d'une réponse intense contre l'haptène. Le risque de leur utilisation trop fréquente est en effet de voir la réponse immunitaire porter
5 majoritairement contre ces protéines, si les sujets immunisés présentent déjà des taux d'anticorps élevés contre celles-ci.

Le second type de porteur utilisé dans ce même vaccin est en fait un extrait de protéines membranaires : l'OMPC, "Outer membrane protein complex", isolé de *Neisseria meningitidis*. Ce complexe vésiculaire contient
10 en fait plusieurs protéines associées à des lipides et des lipopolysaccharides.

Selon un aspect préféré de l'invention, la protéine porteuse comporte au moins une partie d'une protéine de type OmpA de bactéries gram négatif, en particulier d'une protéine de membrane externe de
15 *Klebsiella pneumoniae*.

Des protéines convenant particulièrement à la mise en oeuvre de la présente invention sont des protéines dérivées de la protéine de membrane majeure de *Klebsiella pneumoniae* I-145, désignée ci-après p40; elles présentent notamment l'une des séquences ID n° 2, ID n° 4 ou ID
20 n° 6. D'autres protéines porteuses d'intérêt dérivées de la protéine de membrane externe de *K. Pneumoniae* comprennent des fragments

- contenant la troisième et la quatrième boucle extramembranaire flanquant une séquence intramembranaire,
- contenant une boucle extramembranaire invariable et la séquence
25 intramembranaire adjacente.

On définit comme boucles extramembranaires invariables les séquences de P40 homologues avec les séquences des boucles conservées entre différentes espèces d'entérobactéries. Les séquences des boucles extramembranaires non conservées au cours de l'évolution sont
30 dénommées boucles variables. La localisation des boucles extramembranaires est réalisée d'après le modèle de VOGEL et JAHNIG (1986, *J. Mol. Biol.*, 190 : 191-199) concernant l'OmpA d'*E. coli*.

En particulier, on utilisera les fragments compris entre les acides aminés 127 à 179 de la séquence ID n° 1.

5 D'autres séquences appropriées sont respectivement les séquences comprises entre les amino-acides 108 à 179 de la séquence ID n° 1, les amino-acides 1 à 179 de la séquence ID n° 1, ainsi que des séquences présentant au moins 90% d'homologie avec les séquences précédentes.

Selon un autre aspect avantageux de l'invention, la protéine porteuse comporte tout ou partie du domaine de liaison à la sérumalbumine humaine de la protéine G du streptocoque (ci-après appelée BB).

10 Cette protéine présente une masse moléculaire de 29 kDa et peut être exprimée et produite chez *Escherichia coli* sous forme de corps d'inclusion.

La protéine porteuse peut notamment présenter la séquence ID n° 8, ou une séquence présentant au moins 80%, et de préférence au moins 90% de similarité avec ladite séquence ID n° 8.

15 Toutes ces protéines porteuses peuvent être extraites à partir des bactéries d'origine ou bien être obtenues par la voie de l'ADN recombinant.

Des complexes immunogènes selon l'invention pourront notamment
20 consister en un conjugué entre une protéine porteuse telle que définie précédemment et au moins un oligosaccharide substantiellement purifié, susceptible d'être obtenu à partir de lipopolysaccharides de membrane de bactéries du genre *Salmonella* ; en particulier la bactérie du genre *Salmonella* appartiendra à un sérotype porteur d'une spécificité
25 antigénique choisie dans le groupe suivant : O:1, O:2, O:4, O:6, 7, 8, O:3 et O:9. Dans un mode de réalisation préféré, le complexe immunogène contient un oligosaccharide susceptible d'être obtenu à partir du lipopolysaccharide de *Salmonella enteritidis* de spécificité antigénique O:9.

En effet, les différents sérotypes de *Salmonella* sont identifiés par
30 leur formule antigénique ; il sont classés en différents groupes, en fonction de leur spécificité antigénique O.

Par exemple, *Salmonella typhi* appartient au groupe D, de spécificité O:9, de même que *S. enteritidis*, *S. panama*, et *S. dublin*.

35 Parmi les autres spécificités polysaccharidiques majeures on peut citer :

- le sérogroupe A, de spécificité O:2, ayant comme représentant S. paratyphi A,
- le sérogroupe B, de spécificité O:4, ayant comme représentant S. paratyphi B et S. typhimurium,
- 5 - le sérogroupe C, de spécificité O:6, 7, 8, ayant comme représentant S. infantis et S. bovis morficans,
- le sérogroupe E, de spécificité O:3, avec S. meleagridis

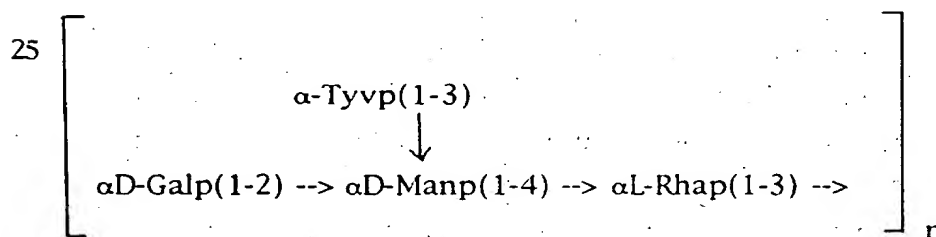
Les oligosaccharides appartenant aux spécificités antigéniques majeures énumérées ci-dessus seront particulièrement adaptés à la mise
 10 en oeuvre de l'invention. Par exemple, un vaccin préparé à partir d'oligosaccharide isolé de lipopolysaccharide de S. enteritidis, porteur de la spécificité antigénique O:9, permettra de protéger contre les septicémies à Salmonella typhi et contre la fièvre typhoïde, mais il pourra également
 15 être utilisé dans la prévention chez l'homme et l'animal des toxico-infections et zoonose dues aux Salmonelles du même sérogroupe.

Des oligosaccharides selon l'un des aspects préférés de l'invention présentent au moins une unité :

α D galactose p(1-2)- α D mannose p(1-4)- α L Rhamnose p(1-3)

20 α tyvelose p(1-3)

Plus particulièrement, l'invention a pour objet un complexe immunogène comprenant au moins un oligosaccharide de formule



30 dans laquelle Gal représente le galactose
 Man représente le mannose
 Rha représente le rhamnose
 Tyv représente le tyvélose

et n peut varier entre 1 et 24.

35

De préférence, n peut varier entre 1 et 5, et l'oligosaccharide est couplé avec une protéine présentant l'une des séquences ID n° 2, ID n° 4, ID n° 6, ou ID n° 8, ou possédant au moins 80% de similarité avec l'une des séquences ID n° 2, ID n° 4 ou ID n° 6 ou ID n° 8.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation de complexes immunogènes tels que définis précédemment, pour la préparation d'un vaccin ; selon un aspect particulièrement avantageux, les complexes sont utiles pour la préparation d'un vaccin destiné à protéger un animal contre les infections provoquées par les bactéries Salmonella appartenant au
10 séro groupe antigénique O:9.

On pourra utiliser un mélange d'oligosaccharides pour lesquels, dans la formule ci-dessus, n aura différentes valeurs.

Des complexes immunogènes selon l'invention sont également ceux comprenant un antigène capsulaire de Salmonella. Celui-ci peut être
15 couplé seul à une protéine porteuse telle que définie précédemment, ou bien associé à un complexe comprenant un autre épitope oligo- ou polysaccharidique.

L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques contenant au moins un oligosaccharide et/ou complexe
20 antigénique tels que définis précédemment. Elles peuvent également contenir d'autres adjuvants d'immunité, et des excipients pharmaceutiquement acceptables nécessaires à leur formulation tels que diluant, stabilisant, conservateurs, etc, connus de l'homme du métier.

Selon un aspect avantageux l'invention concerne un vaccin
25 contenant un oligosaccharide de membrane couplé à une protéine porteuse, et comprenant en outre un autre déterminant antigénique. En particulier le vaccin comprend un antigène capsulaire de Salmonella, tel l'antigène capsulaire Vi (homopolymère d'acide N acétylgalacturonique partiellement acétylé) ; ceci permet d'accroître l'efficacité du vaccin
30 contre les bactéries capsulées.

Le procédé de préparation du complexe immunogène peut comprendre les étapes suivantes :

- a) on isole des oligosaccharides de Salmonella à partir des lipopolysaccharides de membrane,
- 5 b) de manière facultative, on purifie les oligosaccharides de manière à conserver des oligosaccharides de même poids moléculaire,
- c) les oligosaccharides sont activés chimiquement,
- d) les oligosaccharides activés sont couplés à une protéine porteuse pour former le complexe immunogène.

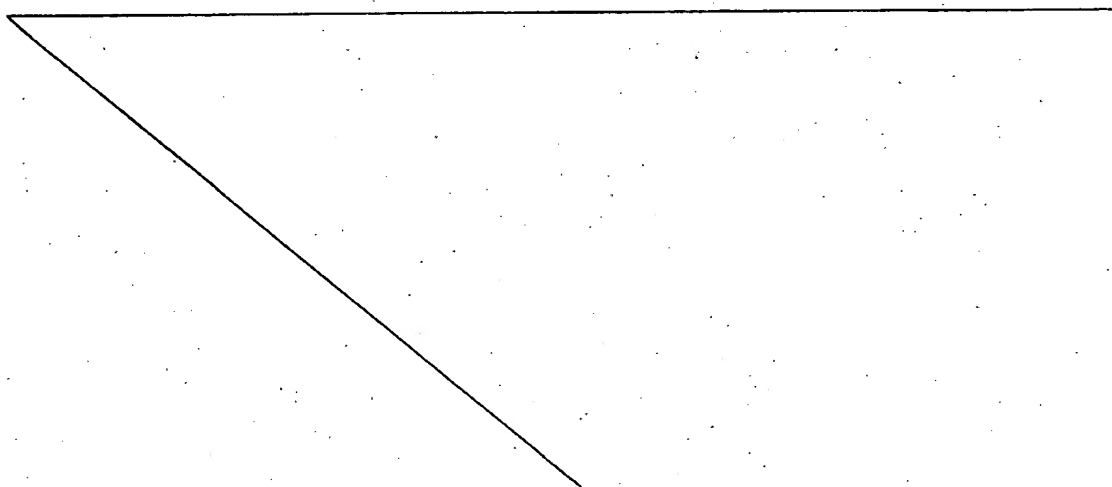
- 10 Selon un aspect préféré, la protéine porteuse est activée avant l'étape d) par une méthode chimique pour faciliter le couplage.

Les méthodes d'activation des oligosaccharides avec formation d'un dérivé isothiocyanatophénylaminé et de couplage de ce dérivé sur une protéine pourront être effectuées comme décrit par:

- 15 - Mc Broom C.R., et al (1972, in: Methods in Enzymology, vol. 28B, ed. V. Ginsburg (Academic Press, New York), p. 212-219), ou
- Svenson S.B. and Lindberg A.A. (1979, J. Immunol. Methods 25, 323-335).

- D'autres méthodes peuvent être utilisées dans le but d'activer les oligosaccharides puis de coupler les dérivés obtenus sur une protéine :
20 méthodes faisant appel aux borohydrure et cyanoborohydrure de sodium, à l'acide adipique dihydrazide...

Ce couplage pourra notamment suivre le schéma suivant :



13

5

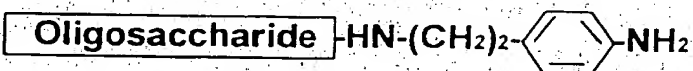


10

NaCNBH₃

Amination réductive

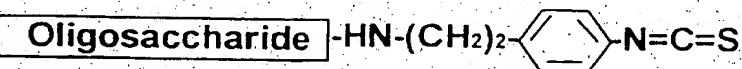
15



20

CsCl₂

Formation d'un isothiocyanate

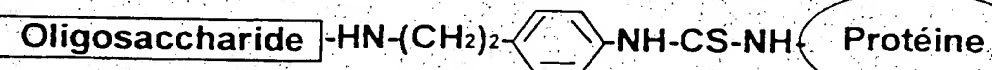


25

2HN-

Couplage

30



Le couplage d'oligosaccharides de différentes tailles peut être envisagé. Ces oligosaccharides étant libérés par coupure enzymatique (activité endorhamnosidasique d'un phage), il s'agira de préférence de multiples de 4: tétrasaccharides, octasaccharides, dodécasaccharides, hexadécasaccharides, icosasaccharides... De même le couplage d'un mélange de ces oligosaccharides (sans purification préalable) est compris dans l'invention.

On peut ensuite effectuer une étape supplémentaire consistant à coupler le complexe obtenu à l'issue de l'étape d) avec un autre déterminant antigénique de Salmonella.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine comportant l'une des séquences ID n° 2, 4, 6 ou 8 pour améliorer l'immunogénicité d'un oligosaccharide.

Elle comprend également l'utilisation de protéines analogues, dans lesquelles au moins un acide aminé a été remplacé par un acide aminé homologue dans les séquences ID n° 2, 4, 6 ou 8.

Les protéines seront notamment codées par des séquences d'ADN présentant l'une des séquences ID n° 1, 3, 5 ou 7 ou des séquences équivalentes, compte tenu de la dégénérescence du code génétique.

La séquence ID n° 2 représente la séquence complète de la protéine P40.

On peut également utiliser une protéine recombinante désignée par LP40 (seq ID n° 4), qui comporte en outre un peptide de 9 acides aminés comportant une partie de la séquence leader de l'opéron tryptophane.

Enfin les séquences ID n° 5 et 6 correspondent à la totalité de la partie transmembranaire, (Δ P40F8), et sont dépourvues de la partie périplasmique très immunogénique (Puohiniemi, R., Karvonen, M., Vuopio-Varkila, J., Muotiala, A., Helander, I.M. and Sarvas, M., 1990, Infect. Immun. 58, 1691-1696).

La séquence ID n° 8 correspond au domaine de liaison à la sérulalbumine humaine de la protéine G du Streptocoque.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples, on se référera aux figures suivantes :

Figure 1 : Mise en évidence du pouvoir immunogène du conjugué P40-icosasaccharide chez la souris.

Figure 2 : Mise en évidence du pouvoir immunogène du conjugué P40-icosasaccharide chez le lapin.

5

EXEMPLE 1: Isolement et purification de la protéine P40 naturelle.

10 La protéine P40, protéine majeure de la membrane externe de *Klebsiella pneumoniae* est isolée par extraction en présence d'un détergent à partir de la biomasse *Klebsiella pneumoniae*, puis purifiée à partir de l'extrait ainsi obtenu par chromatographie d'échange d'anions puis de cations.

15 1.1. Matériel et méthodes.

1.1.1. Extraction des protéines membranaires.

20 Le pH de la biomasse *Klebsiella pneumoniae* (souche I-145, 40 à 340g de cellules sèches, 7 à 10 % de cellules sèches) est ajustée à pH 2,5 avec de l'acide acétique pur. Après addition de 0,5 volume d'une solution contenant 6% cétrimide (détergent), 60% éthanol, CaCl_2 1,5M (concentrations finales 2% cétrimide, 20% éthanol, CaCl_2 0,5 M), le pH est ajusté à 2,5 et le mélange est placé sous agitation pendant 16 heures à température ambiante.

25

1.1.2. Etape de clarification.

30 Après centrifugation 20 min à 15000g à 4°C, le culot est éliminé. Le surnageant est un extrait de protéines membranaires de *Klebsiella pneumoniae*.

1.1.3. Précipitation des protéines membranaires.

35 Les protéines du surnageant sont précipitées par addition de 3 volumes d'éthanol 95 ° à -20°C (concentration finale en éthanol = 80%).

Après une agitation rapide, l'ensemble est laissé au repos pendant 1 heure à 4°C minimum. Les protéines précipitées sont recueillies par centrifugation 10 min à 10000g à 4°C.

5 1.1.4. Préparation d'une fraction enrichie en protéines membranaires (fraction MP).

10 Les culots sont remis en suspension dans une solution 1 % de Zwittergent 3-14 à raison de 5ml/g de culot humide. Après agitation pendant 1 heure (agitateur à hélice) et broyage à l'aide d'un ultra-turrax (13500trs/min, 30 sec), le pH est ajusté à 6,5 à l'aide de soude 1N. Une centrifugation du mélange permet d'obtenir la fraction MP (élimination de l'insoluble).

15 1.1.5. Etape de chromatographie d'échange d'anions.

20 Les protéines du MP sont dialysées pendant une nuit à 4°C contre un tampon Tris/HCl 20mM pH 8,0, 0,1% Zwittergent 3-14. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur d'anions forts (gel Biorad Macro Prep High Q) équilibrée dans le tampon décrit ci-dessus à un débit linéaire de 15 cm/h. Les protéines sont détectées à 280nm. La protéine P40 est éluée, avec un débit linéaire de 60 cm/h, pour une concentration de 0,2M en NaCl dans le tampon Tris/HCl 20mM pH 8,0; 0,1% Zwittergent 3-14.

25

1.1.6. Etape de chromatographie d'échange de cations.

30 Les fractions contenant la protéine P40 sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration à l'aide d'un système de cellule à agitation Amicon utilisé avec une membrane Diaflo de type YM10 (seuil de coupure 10kDa) pour des volumes de l'ordre de 100ml, ou à l'aide d'un système de filtration à flux tangentiel Minitan Millipore utilisé avec des plaques de membranes possédant un seuil de coupure 10kDa pour des volumes supérieurs. La fraction ainsi concentrée est dialysée pendant une nuit à

4°C contre un tampon citrate 20mM pH3,0, 0,1 % Zwittergent 3-14. Le dialysat est déposé sur une colonne contenant un support de type échangeur de cations forts (gel Biorad Macro Prep High S) équilibrée dans le tampon citrate 20mM pH3,0, 0,1 % Zwittergent 3-14. La protéine P40 est éluée (vitesse 61 cm/h) pour une concentration 0,7M en NaCl. Les fractions contenant la P40 sont rassemblées et concentrées comme décrit précédemment.

1. 2. Résultats.

10

Les fractions obtenues après chaque étape chromatographique sont analysées par SDS PAGE afin de rassembler celles contenant la protéine P40.

15

Après chaque étape, les quantités de protéine sont déterminées par dosage selon la méthode de Lowry. La pureté et l'homogénéité de la protéine P40 sont estimées par SDS PAGE avec révélations au bleu de coomassie et au nitrate d'argent.

20

En fin de procédé de purification, la P40 est concentrée dans le but d'atteindre une concentration en protéine de l'ordre de 5 à 10 mg/mL. Les profils électrophorétiques révèlent un degré de pureté supérieur à 90%.

Après immunoblot, la protéine est reconnue spécifiquement par un anticorps monoclonal anti-P40 obtenu chez la souris.

25

La présence de lipopolysaccharides (endotoxines) contaminants est estimée par la méthode de gélification en tubes ou essai LAL (Lysat d'Amébocytes de Limule). Cet essai réalisé sur la solution finale révèle un taux d'endotoxines inférieur à 160 UE/ml et montre donc que celle-ci satisfait aux normes de la réglementation européenne.

30

EXEMPLE 2: Clonage, expression et purification de la protéine P40 recombinante.

2.1. Matériel et méthodes:

2.1.1. Clonage du gène de l'OmpA de *Klebsiella pneumoniae*.

Les amorces nucléotidiques ont été déterminées à partir de la partie de la séquence publiée de l'OmpA de *Klebsiella pneumoniae* LD 199 (Lawrence J.G. et al., 1991, J. Gen. Microbiol. 137, 1911-1921), de la séquence consensus issue de l'alignement des séquences de l'OmpA de différentes entérobactéries (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenosae*) ainsi que des séquences de peptides obtenues par séquençage selon la méthode d'Edman de la protéine naturelle isolée de *Klebsiella pneumoniae* I-145 et de peptides isolés après digestion au bromure de cyanogène.

Les oligonucléotides ont été synthétisés selon la méthode chimique des phosphoramidites à l'aide de l'appareil Pharmacia Gene Assembler Plus.

Une colonie de *Klebsiella pneumoniae* I-145 est lysée dans 10 μ l de tampon de lyse (25mM Taps pH 9,3, 2mM MgCl₂). 1 μ l de cette solution est ensuite utilisé comme source d'ADN pour les réactions d'amplification par PCR. Celles-ci sont réalisées dans 100, μ l de tampon d'amplification avec 5pmoles de chaque amorce et une unité enzymatique de Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). Chaque cycle comprend une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C suivie d'une hybridation de l'amorce avec l'ADN et d'une extension d'une minute à 72°C. 30 cycles sont ainsi réalisés à l'aide d'un thermocycleur Perkin Elmer Cetus Gen Amp PCR 9000. Le gène de l'OmpA de *Klebsiella pneumoniae* est cloné dans le vecteur pRIT28 (Hultman T. et al., 1988, Nucleosides Nucleotides 7, 629-638), vecteur possédant le gène de résistance à l'ampicilline, les origines de répllication de *Escherichia coli* et du phage F1 ainsi qu'une portion du gène Lac-Z de *Escherichia coli* (β -galactosidase).

Le fragment ainsi cloné est séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique Applied Biosystem 373 DNA Séquenceur. Les réactions de séquençage sont réalisées à l'aide du kit dye terminator selon les recommandations du fournisseur.

2.1.2. Construction du vecteur d'expression contenant le gène de l'OmpA de *Klebsiella pneumoniae*.

Le gène entier de la protéine P40 est ensuite cloné dans le vecteur d'expression pTrp inducible par la présence du gène de l'opéron tryptophane, porteur du gène de résistance à la kanamycine et présentant deux sites de restriction BsmI et Sall.

Pour le clonage un site de restriction BsmI est introduit par PCR en amont du gène de la P40, présentant déjà un site Sall en aval, dans le vecteur pRIT28P40. Le gène de la P40 possédant des sites BsmI/Sall est ainsi cloné dans le vecteur pTrp pour constituer le plasmide pTrpLP40.

2.1.3. Expression de la protéine LP40.

La protéine de fusion LP40 est exprimée et produite chez *Escherichia coli* sous forme de corps d'inclusion. Celle-ci comportera la séquence complète de l'OmpA de *Klebsiella pneumoniae* à laquelle il faut ajouter au niveau de l'extrémité N-terminale un peptide de 8 acides aminés (peptide L) comportant une partie de la séquence leader de l'opéron tryptophane nécessaire à l'expression de la protéine chez *Escherichia coli*.

L'expression de la protéine LP40 est réalisée chez *Escherichia coli* RRIAM15 (Rüther, U., 1982, Nucl. Acid Res. 10 5765-5772). Une préculture est réalisée sous agitation à 37°C pendant une nuit dans un milieu à base de bouillon tryptique de soja (milieu TSB) complémenté en extrait de levure et en présence de kanamycine 30 µg/ml. La région opératrice du vecteur est bloquée en présence d'un excès de tryptophane (100 µg/ml).

Après lecture de la densité optique à 580nm, la culture est diluée afin d'obtenir une densité optique de 1 dans le milieu précédent (milieu TSB avec extrait de levure et kanamycine). La synthèse de la protéine LP40 est induite par addition d'acide indolacrylique (analogue du tryptophane) à la concentration finale de 25 µg/ml. La culture est maintenue à 37°C sous agitation pendant 5 heures.

2.1.4. Renaturation et purification de la protéine LP40.

Après centrifugation (4000rpm, 10 min, 4°C), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris HCl 25mM pH 8,5. Une sonication permet la libération des corps d'inclusion.

Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (25 min à 10000g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl 25mM pH 8,5 contenant 5mM MgCl₂, puis centrifugé (15 min à 10000g). La dénaturation de la protéine est obtenue par incubation des corps d'inclusion à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl 25mM pH 8,5 contenant 7M chlorhydrate de guanidinium ou urée (agent dénaturant) et 10mM dithiothréitol (réduction des ponts disulfure). Une centrifugation (15 min à 10000g) permet d'éliminer la partie insoluble des corps d'inclusion.

Après dilution par 13 volumes d'un tampon Tris HCl 25mM pH 8,5 contenant du NaCl (8,76g/l et du Zwittergent 3-14 (0,1%, p/v), le mélange est laissé pendant une nuit à température ambiante sous agitation au contact de l'air (renaturation par dilution et réoxydation des ponts disulfure).

Après une nouvelle centrifugation, l'échantillon est dialysé contre un tampon Tris-HCl 25mM pH 8,5 contenant 0,1 % Zwittergent 3-14 (100 volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C. L'étape de chromatographie d'échange d'anions est réalisée sur le support Biorad Macro Prep High Q comme décrit précédemment (Exemple 1). Les fractions contenant la protéine LP40 sont rassemblées puis concentrées par ultrafiltration avant une nouvelle dialyse contre un tampon citrate 20mM pH 3 contenant 0,1% Zwittergent 3-14 (100 volumes de tampon) pendant une nuit à 4°C. L'étape de chromatographie d'échange de cations est réalisée sur le support Biorad Macro Prep High S comme décrit à l'exemple 1. Les fractions contenant la LP40 sont rassemblées puis concentrées par ultrafiltration.

2. 2. Résultats.

Le gène de l'OmpA de *Klebsiella pneumoniae* (P40) comporte 1008 paires de bases (Séquence ID N° 1) et code pour une protéine de 335 acides aminés (Séquence ID N° 2).

Le gène de la LP40 comporte quant à lui 1035 paires de bases (Séquence ID N° 3) et code pour une protéine de 344 acides aminés (Séquence ID N° 4). En ce qui concerne la partie du gène de l'OmpA, on constate quelques différences au niveau de l'extrémité codant pour les deux acides aminés en position C-terminale. Ces différences concernent en fait uniquement trois nucléotides. Il s'agit des nucléotides en position 1027 (C pour G en position 1000 dans la séquence de la P40), 1028 (A pour C en position 1001 dans la séquence de la P40), 1032 (C pour T en position 1005 dans la séquence de la P40). Ces modifications sont dues à l'utilisation lors du clonage du gène de l'OmpA dans le vecteur pRIT28 d'une amorce oligonucléotidique partiellement dégénérée (séquence Kpn14): 5'ATAGTCGACAACTTA A(G)G(C)CCTGCGGCTGAG3'. Ces modifications de la séquence du gène provoquent une unique différence entre les séquences peptidiques de la P40 et de la LP40 exprimée et produite chez *Escherichia coli*. Il s'agit de l'acide aminé en position 343 de la séquence de la LP40, qui est un résidu glutamine (Gln) alors qu'un résidu alanine (Ala) est trouvé dans la séquence de la LP40 (position 334).

A partir d'une culture de 1 litre, un cycle de dénaturation-renaturation permet d'obtenir 300mg de protéine (estimation par dosage selon la méthode de Lowry). 75mg de LP40 sont purifiés après les deux étapes chromatographiques.

Comme précédemment la protéine LP40 est concentrée après purification afin d'atteindre une concentration finale comprise entre 5 et 10mg/ml. Les profils électrophorétiques montrent un degré de pureté de l'ordre de 95%. Après immunoblot la protéine est spécifiquement reconnue par un anticorps monoclonal anti-P40 naturelle obtenu chez la souris.

L'état de la protéine est suivi par SDS-PAGE. Selon sa forme, dénaturée ou native, la protéine P40 extraite de la membrane de *Klebsiella pneumoniae* possède un comportement électrophorétique (migration) caractéristique. La forme native (structure en feuillets β) présente en effet une masse moléculaire plus faible que la forme dénaturée (structure en hélices α) sous l'action d'un agent dénaturant, tel que l'urée ou le chlorhydrate de guanidinium, ou par chauffage à 100°C en présence de

SDS. La protéine LP40 n'est pas correctement renaturée en fin de renaturation, que celle-ci soit réalisée en absence ou en présence de 0,1% (p/v) Zwittergent 3-14. Par contre une renaturation totale est obtenue après dialyse contre un tampon Tris/HCl 25mM pH 8,5 contenant 0,1 % (p/v) Zwittergent 3-14. Toutefois il faut noter que cette renaturation n'est obtenue que lorsque l'étape de dilution et le traitement à température ambiante sont réalisés eux-mêmes en présence de Zwittergent 3-14 (résultats négatifs en absence de détergent).

10 EXEMPLE 3: Clonage, expression et purification de la partie transmembranaire de la protéine P40.

Afin de cloner la partie du gène correspondant à la totalité de la partie transmembranaire dépourvue de la partie périplasmique de la protéine P40 un oligonucléotide complémentaire de l'extrémité codant pour la partie C-terminale de cette région du gène, séquence comprise entre les acides aminés 1 à 179 de la protéine P40 et baptisée fragment F8, a été synthétisé.

La séquence du gène correspondant au fragment recherché a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN d'une miniprep du vecteur pRIT28P40, puis purifiée et clonée dans le même vecteur. Un séquençage est réalisé afin de vérifier qu'aucune mutation n'est survenue au cours de l'amplification.

Ce gène est ensuite cloné comme décrit précédemment (Exemple 2) dans le vecteur pTrp pour constituer le plasmide pTrpLAP40F8.

La protéine de fusion LAP40F8 est exprimée chez *Escherichia coli* RRI après transfection par le vecteur pTrpLAP40F8. Après un cycle de dénaturation/renaturation, celle-ci est purifiée par chromatographie d'échange d'anions puis de cations comme décrit précédemment (Exemple 1).

Le gène de la protéine LAP40F8 comporte 567 paires de bases (séquence ID n° 5) et code une protéine de 118 acides aminés (séquence ID n° 6).

EXEMPLE 4 : Expression et purification de la protéine BB

4.1. Matériel et méthodes

4.1.1. Expression de la protéine BB

5

Le gène de la protéine BB est cloné dans le vecteur d'expression pva inducible par la présence du gène de l'opéron tryptophane, porteur des gènes de résistance à l'ampicilline et à la tétracycline et possédant une origine de réplication chez *Escherichia coli*. La protéine BB est exprimée et produite chez *Escherichia coli* RV 308 (souche ATCC 31608) sous forme de corps d'inclusion.

10

Les souches de *Escherichia coli* RV 308 compétentes sont transformées par le vecteur pvaBB. Une préculture est réalisée sous agitation à 37°C pendant une nuit dans un milieu à base de bouillon tryptique de soja (milieu TSB) complémenté en extrait de levure et en présence de tétracycline (8µg/ml) et ampicilline (200µg/ml). La région opératrice du vecteur est bloquée en présence d'un excès de tryptophane (100µg/ml).

15

Après lecture de la densité optique à 580nm, la culture est diluée afin d'obtenir une densité optique de 1 dans le milieu précédent (milieu TSB avec extrait de levure et tétracycline/ampicilline). La synthèse de la protéine BB est induite par addition d'acide indolacrylique (analogue du tryptophane) à la concentration finale de 25µg/ml. La culture est maintenue à 37°C sous agitation pendant 5 heures.

20

25

4.1.2. Renaturation et purification de la protéine BB

Après centrifugation (4000rpm, 10 min., 4°C), les cellules sont remises en suspension dans un tampon Tris-HCl 25mM pH 8,5. Une sonication permet la libération des corps d'inclusion.

30

Le culot de corps d'inclusion obtenu par centrifugation (25 min à 10000g à 4°C) est repris dans un tampon Tris-HCl 25mM pH 8,5 contenant 5mM MgCl₂, puis centrifugé (15 min à 10000g). La dénaturation de la protéine est obtenue par incubation des corps d'inclusion à 37°C pendant 2 heures dans un tampon Tris-HCl 25mM pH 8,5 contenant 7M chlorhydrate de guanidinium (agent dénaturant) et 10mM dithiothréitol (réduction des ponts disulfure). Une centrifugation (15 min à 10000g) permet d'éliminer la partie insoluble des corps d'inclusion.

Après dilution par 13 volumes d'un tampon Tris-HCl 25mM pH 8,5 contenant du NaCl (8,76g/l et du Zwittergent 3-14 (0,1%, p/v), le mélange est laissé pendant une nuit à température ambiante sous agitation au contact de l'air (renaturation par dilution et réoxydation des ponts disulfure).

Après une nouvelle centrifugation, la protéine BB est purifiée par chromatographie d'affinité sur support HSA-Sépharose (support préparé par couplage d'albumine sérique humaine sur un gel Pharmacia "CNBr-activated Sepharose 4B"). Après injection (débit faible), les protéines non fixées sont éluées par un tampon Tris/HCl 25mM pH 8,5, NaCl 0,2M, 0,05% Tween 20 et EDTA 1mM. La protéine BB retenue sur le support est éluée par une solution d'acide acétique 0,5M pH 2,7. Les fractions contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées puis concentrées par ultrafiltration.

4.2. Résultats

Le gène de la protéine BB comporte 774 paires de bases (Séquence ID N° 7) et code pour une protéine de 257 acides aminés (Séquence ID N° 8).

La protéine exprimée comporte à partir de l'extrémité N-terminale (voir Séquence ID N° 7) :

- le peptide L, acides aminés 1 à 8,
- le peptide E', acides aminés 9 à 14,
- un peptide linker, acides aminés 15 à 23,
- la protéine BB, acides aminés 24 à 257.

La protéine produite présente une masse moléculaire de 29kDa environ (analyse par SDS-PAGE).

EXEMPLE 5: Isolement et purification des oligosaccharides de *Salmonella enteritidis* à partir de lipopolysaccharides.

4.1. Préparation des lipopolysaccharides (LPS).

5 Les bactéries *Salmonella enteritidis* SH 1262 sont cultivées dans un fermenteur de 10 litres à 37°C, à pH 7,0, sous agitation forte, dans un milieu Ty. Les cellules sont tuées par addition de formaldéhyde 1% et sont
10 recueillies par centrifugation à 4000g pendant 20 min à 4°C. Après un lavage dans du PBS et une nouvelle centrifugation, réalisée comme précédemment, le culot est remis en suspension à une concentration de l'ordre de 20mg (poids sec)/ml. Les LPS sont extraits par la méthode au phénol (Westphal O., Lüderitz O. and Bister-F., 1952, Z. Naturforsch. Z, 148-155) et la phase aqueuse est recueillie et lyophilisée.

15 Des LPS partiellement délipidés sont préparés par hydrolyse des liaisons phosphate et ester au niveau de la partie lipidique (lipide A) par un traitement réalisé en présence de soude 0,15M à 100°C pendant 2 heures. Après centrifugation, le pH est ajusté à 3,5 et les acides gras libres sont éliminés par extractions successives au chloroforme. Le pH est
20 ensuite ajusté à 7,0 avant que les LPS ainsi délipidés ne soient dialysés contre de l'eau et finalement lyophilisés.

4.2. Préparation des oligosaccharides.

25 Les oligosaccharides sont préparés à partir des LPS partiellement délipidés en utilisant l'activité endorhamnosidase associée au bactériophage P36.

Dans un boudin de dialyse contenant le phage P36, dialysé au préalable contre un tampon carbonate d'ammonium 5mM pH 7,1, sont
30 ajoutés les LPS obtenus précédemment dans un rapport Ig de LPS/10¹⁴ p.f.u. de phage. La dialyse est réalisée à 37°C contre 600 à 800 ml du tampon précédent. Après 50 heures le bain de dialyse est changé et la dialyse est renouvelée pour une durée additionnelle de 40 heures environ. Les deux solutions de contre dialyse sont ensuite mélangées puis concentrées à
35 l'aide d'un évaporateur rotatif.

Les oligosaccharides sont fractionnés par chromatographie de tamisage moléculaire. Les oligosaccharides concentrés sont déposés sur une colonne (2,5 x 170 cm) de Biogel P2 ou P4 (Biorad, 200-400 mesh) éluée par de l'eau (débit 8,5 ml/h). Les fractions contenant les oligosaccharides sont détectées par la méthode au phénol (+ acide sulfurique). Après analyse des fractions par chromatographie sur couche mince, les fractions contenant les différents isomères sont rassemblées puis lyophilisées. La pureté des oligosaccharides obtenus est déterminée par résonance magnétique nucléaire et spectrométrie de masse.

EXEMPLE 6: Couplage des oligosaccharides isolés de lipopolysaccharides de *Salmonella enteritidis* à la protéine P40.

Les oligosaccharides (10 à 40mg) sont dissouts dans 0,5ml d'eau. Cette solution d'oligosaccharides est ajoutée goutte à goutte sous agitation à 1 ml d'une solution de para-aminophényléthylamine diluée dans l'eau (v/v), contenant 20 mg de cyanoborohydrure de sodium. Après ajustement du pH à 8,0 à l'aide de NaOH 1N, le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 24 heures. L'excès de réactifs est éliminé par gelfiltration sur une colonne de Biogel P2. Les fractions contenant les oligosaccharides dérivés sont recueillies, concentrées à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif puis les oligosaccharides sont repris par 3ml d'éthanol 80%.

L'addition de 200 μ l d'une solution de thiophosgène dilué dans de l'éthanol 80% (1v/3v) permet l'obtention de dérivés isothiocyanto-p-aminophényléthylamino-oligosaccharides. Le pH est maintenu à l'aide d'une solution de soude 1M dans l'éthanol 80%. Après 2 heures à température ambiante la réaction est complète, et les oligosaccharides dérivés sont séparés de l'excès de réactifs par extraction chloroformique (élimination du thiophosgène). La phase aqueuse est concentrée à sec et les oligosaccharides sont repris par 0,5ml de tampon bicarbonate 0,1M pH 8,2 contenant 0,1% Zwittergent 3-14.

La protéine P40 (LP40 ou Δ P40F8) en solution dans un tampon bicarbonate 0,1M pH 8,2 contenant 0,1% Zwittergent 3-14 (2,3 ml, concentration de l'ordre de 5 mg/ml) est ajoutée goutte à goutte sous agitation constante aux oligosaccharides. Le pH est ajusté à 8,7 à l'aide de soude 1M et le mélange réactionnel est maintenu à température ambiante pendant 48 heures. Les oligosaccharides non couplés sont éliminés par une série de plusieurs dilutions et concentrations à l'aide d'une cellule à agitation Amicon équipée d'une membrane Diaflo possédant un seuil de coupure de 30kDa. Les conjugués obtenus sont dialysés plusieurs fois contre 1 litre de tampon PBS contenant 0,1% Zwittergent 3-14. Le taux de substitution est déterminé après estimation des quantités d'oligosaccharides par la méthode de dosage faisant appel au phénol (+ acide sulfurique), et de protéine par la méthode de Lowry. Les conjugués sont conservés à -20°C.

Dans le cas du conjugué P40-icosasaccharide le degré de substitution estimé par dosage des protéines et des oligosaccharides est de 5,3 moles d'icosasaccharides/mole de P40. Cette valeur est en accord avec celle établie après SDS PAGE du conjugué.

EXEMPLE 7: Mise en évidence du pouvoir immunogène des conjugués P40/icosasaccharide chez la souris.

6.1. Matériel et méthodes.

Les souris (femelles NMRI, 1S20g, 6/lot) sont immunisées aux jours 0, 14 et 21. Chaque souris reçoit une dose de 0,5ml du conjugué préparé à l'exemple 3. Les conjugués (10 μ g) sont injectés en présence ou en l'absence d'adjuvant complet de Freud et les injections sont effectuées par voie intrapéritonéale. Les prélèvements sanguins sont réalisés par ponction aux jours 0 et 35. Les réponses anticorps sont évaluées sur les sérums individuels prélevés par la méthode ELISA. Les IgG anti-icosasaccharide des sérums sont isolées sur support BSA-hexadécasaccharide et sont révélées à l'aide d'un antisérum anti-IgG de souris marqué à la phosphatase alcaline. La densité optique est déterminée à 405nm.

6.2. Résultats.

Lorsqu'il est injecté en présence d'adjuvant complet de Freud, le conjugué P40/icosasaccharide permet l'induction d'une réponse dirigée contre l'oligosaccharide importante dès le jour 35 (3 immunisations): le titre anticorps est proche de $1/1.10^5$.

Comme le montre la figure 1 ce titre se maintient lorsque les immunisations sont réalisées en l'absence d'adjuvant. Les titres anticorps anti-oligosaccharide sont en effet compris entre $1/1.10^4$ et $1/1.10^5$.

EXEMPLE 8: Mise en évidence du pouvoir immunogène des conjugués P40/icosasaccharide chez le lapin.

7.1. Matériel et méthodes.

Les lapins (lapins blancs de Nouvelle Zélande, 2-3kg) sont immunisés aux jours 0,14 et 28. Les conjugués P40/oligosaccharides ($10 \mu\text{g}$) sont injectés aux animaux dans les ganglions lymphatiques poplitéaux en présence (v/v) ou absence d'adjuvant complet de Freud. Aux jours 0, 14, 28 et 56, des prélèvements sanguins sont effectués et les réponses anticorps sont évaluées sur les sérums individuels par la méthode ELISA. Les plaques de titrage sont couvertes par 2 antigènes différents: la protéine P40 et le LPS dont sont issus les oligosaccharides couplés à la P40. Les anticorps sont révélés à l'aide d'un conjugué anti-IgG de lapin marqué à la phosphatase alcaline. La densité optique est déterminée à 405nm.

7.2. Résultats.

L'icosasaccharide, lorsqu'il est présenté par la protéine P40, induit en présence d'adjuvant de Freud une réponse importante contre le lipopolysaccharide dont il est issu: titre supérieur à $1/1.10^6$.

En absence d'adjuvant la réponse dirigée contre l'icosasaccharide lorsqu'il est présenté par la P40 est plus faible que celle obtenue en présence d'adjuvant, mais significativement plus importante que celle induite après injection du conjugué BSA-octasaccharide. La figure 2 présente les résultats du dosage ELISA réalisé contre le LPS dont est issu l'icosasaccharide couplé à la protéine P40. Après 56 jours le titre anticorps est supérieur à 1/10000.

EXEMPLE 9: Experience de challenge chez la souris après transfert passif.

8.1. Matériel et méthodes.

Les souris (femelles NMRI, 20g, 6/lot) reçoivent une injection par voie intraveineuse de 0,2ml d'un sérum hyperimmun obtenu chez le lapin après un cycle d'immunisations réalisé dans les conditions précédemment décrites à l'exemple 5 (injections en absence d'adjuvant, prélèvement du sérum à J56).

Le challenge par des bactéries *Salmonella enteritidis* SH 2204 est réalisé 2 à 3 heures après injection du sérum hyperimmun. Les bactéries sont injectées à l'animal par voie intrapéritonéale. Trois doses différentes sont utilisées: 1,3 - 13 et 52 fois la DL50 ($DL50 = 2,6 \cdot 10^5$ cellules/ml). Les souris sont observées jusqu'à 60 jours après l'injection.

8.2. Résultats.

Les anticorps obtenus chez le lapin après immunisation par le conjugué P40-icosasaccharide permettent, après injection par voie intraveineuse, de protéger des souris contre une infection par *Salmonella enteritidis*. 60 jours après des challenges réalisés par injection de doses de l'ordre de 1,3 et 13 fois la DL50 toutes les souris sont vivantes (Tableau 1), la dose 52 x DL50 étant quant à elle excessive (mort des animaux).

Tableau 1: Expériences de challenge chez la souris après transfert passif d'un sérum hyperimmun de Lapin ou après immunisation par le conjugué P40-icosasaccharide.

5 Détermination du pourcentage d'animaux vivants 60 jours après injection par voie intrapéritonéale d'une dose de bactéries *Salmonella enteritidis*.

10	Dose de <i>Salmonella enteritidis</i>	Challenge après transfert passif	Challenge après immunisation
	1,3 x DL50	100 %	100 %
15	13 x DL50	100 %	100 %
	52 x DL50	0	0

20 **EXEMPLE 10:** Expérience de challenge chez la souris après immunisation par le conjugué P40/icosasaccharide.

9.1. Matériel et méthodes.

25 Les souris (femelles NMRI, 20g, 6/lot) sont immunisées par le conjugué P40/icosasaccharide en absence d'adjuvant comme décrit dans l'exemple 4.

Au jour 42 le challenge par les bactéries *Salmonella enteritidis* SH 2204 est réalisé comme décrit précédemment dans l'exemple 6.

30

9.2. Résultats.

35 La vaccination par le conjugué P40-icosasaccharide permet de protéger directement les souris contre un challenge par *Salmonella enteritidis*. Les immunisations par ce conjugué permettent en effet d'augmenter la DL50 par un facteur 10 au minimum (Tableau 1), la DL50 pouvant alors être supérieure à $3,4 \cdot 10^6$ /ml.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: PIERRE FABRE MEDICAMENT
- (B) RUE: 45 PLACE ABEL GANCE
- (C) VILLE: BOULOGNE
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 92100

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 8

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: Apple Macintosh
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: MAC OS Systeme 7

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) Longueur : 1008 paires de bases
- (B) Type : acide nucléique
- (C) Nombre de brins : simple
- (D) Configuration : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..1008

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG TAT GCA GGT GGT AAA CTG GGT TGG TCC
 Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser
 1 5 10 15

48

CAG TAT CAC GAC ACC GGT TTC TAC GGT AAC GGT TTC CAG AAC AAC AAC Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn 20 25 30	96
GGT CCG ACC CGT AAC GAT CAG CTT GGT GCT GGT GCG TTC GGT GGT TAC Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr 35 40 45	144
CAG GTT AAC CCG TAC CTC GGT TTC GAA ATG GGT TAT GAC TGG CTG GGC Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly 50 55 60	192
CGT ATG GCA TAT AAA GGC AGC GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln 65 70 75 80	240
GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA CTG GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu 85 90 95	288
GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC GGC ATG GTT TGG CGC GCT GAC TCC AAA Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys 100 105 110	336
GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC GTT TCC CGT AGC GAA CAC GAC ACT GGC Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly 115 120 125	384
GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp 130 135 140	432
ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala 145 150 155 160	480
GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val 165 170 175	528
TCC TAC CGC TTC GGT CAG GAA GAT GCT GCA CCG GTT GTT GCT CCG GCT Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala 180 185 190	576
CCG GCT CCG GCT CCG GAA GTG GCT ACC AAG CAC TTC ACC CTG AAG TCT Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser 195 200 205	624

GAC GTT CTG TTC AAC TTC AAC AAA GCT ACC CTG AAA CCG GAA GGT CAG Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln 210 215 220	672
CAG GCT CTG GAT CAG CTG TAC ACT CAG CTG AGC AAC ATG GAT CCG AAA Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys 225 230 235 240	720
GAC GGT TCC GCT GTT GTT CTG GGC TAC ACC GAC CGC ATC GGT TCC GAA Asp Gly Ser Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu 245 250 255	768
GCT TAC AAC CAG CAG CTG TCT GAG AAA CGT GCT CAG TCC GTT GTT GAC Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp 260 265 270	816
TAC CTG GTT GCT AAA GGC ATC CCG GCT GGC AAA ATC TCC GCT CGC GGC Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly 275 280 285	864
ATG GGT GAA TCC AAC CCG GTT ACT GGC AAC ACC TGT GAC AAC GTG AAA Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys 290 295 300	912
GCT CGC GCT GCC CTG ATC GAT TGC CTG GCT CCG GAT CGT CGT GTA GAG Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu 305 310 315 320	960
ATC GAA GTT AAA GGC TAC AAA GAA GTT GTA ACT CAG CCG GCG GGT TAA Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly 325 330 335	1008

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) Longueur : 335 acides aminés
- (B) Type : acide aminé
- (C) Nombre de brins : simple
- (D) Configuration : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr
 1 5 10 15
 His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg
 20 25 30 35
 Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu
 40 45 50
 Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val
 55 60 65 70
 Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr
 75 80 85 90
 Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg
 95 100 105
 Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp
 110 115 120 125
 Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp
 130 135 140
 Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr
 145 150 155 160
 Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe
 165 170 175 180
 Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu
 185 190 195
 Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn Lys
 200 205 210 215
 Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr Gln Leu
 220 225 230
 Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr Asp Arg
 235 240 245 250
 Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val
 255 260 265 270
 Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly
 275 280 285

35

Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg
 290 295 300 305

Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys
 310 315 320

Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro Ala Gly
 325 330 335

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) Longueur : 1035 paires de bases
- (B) Type : acide nucléique
- (C) Nombre de brins : simple
- (D) Configuration : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLACEMENT: 1..1035

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATG AAA GCA ATT TTC GTA CTG AAT GCG GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG	48
Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp	
1 5 10 15	
TAT GCA GGT GGT AAA CTG GGT TGG TCC CAG TAT CAC GAC ACC GGT TTC	96
Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe	
20 25 30	
TAC GGT AAC GGT TTC CAG AAC AAC AAC GGT CCG ACC CGT AAC GAT CAG	144
Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln	
35 40 45	
CTT GGT GCT GGT GCG TTC GGT GGT TAC CAG GTT AAC CCG TAC CTC GGT	192
Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly	
50 55 60	
TTC GAA ATG GGT TAT GAC TGG CTG GGC CGT ATG GCA TAT AAA GGC AGC	240
Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser	
65 70 75 80	

GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys 85 90 95	288
CTG GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly 100 105 110	336
GGC ATG GTT TGG CGC GCT GAC TCC AAA GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly 115 120 125	384
GTT TCC CGT AGC GAA CAC GAC ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly 130 135 140	432
GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr 145 150 155 160	480
CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro 165 170 175	528
GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT TCC TAC CGC TTC GGT CAG GAA Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu 180 185 190	576
GAT GCT GCA CCG GTT GTT GCT CCG GCT CCG GCT CCG GCT CCG GAA GTG Asp Ala Ala Pro Val Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val 195 200 205	624
GCT ACC AAG CAC TTC ACC CTG AAG TCT GAC GTT CTG TTC AAC TTC AAC Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn 210 215 220	672
AAA GCT ACC CTG AAA CCG GAA GGT CAG CAG GCT CTG GAT CAG CTG TAC Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln Ala Leu Asp Gln Leu Tyr 225 230 235 240	720
ACT CAG CTG AGC AAC ATG GAT CCG AAA GAC GGT TCC GCT GTT GTT CTG Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser Ala Val Val Leu 245 250 255	768
GGC TAC ACC GAC CGC ATC GGT TCC GAA GCT TAC AAC CAG CAG CTG TCT Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln Leu Ser 260 265 270	816

GAG AAA CGT GCT CAG TCC GTT GTT GAC TAC CTG GTT GCT AAA GGC ATC 864
 Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
 275 280 285

CCG GCT GGC AAA ATC TCC GCT CGC GGC ATG GGT GAA TCC AAC CCG GTT 912
 Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val
 290 295 300

ACT GGC AAC ACC TGT GAC AAC GTG AAA GCT CGC GCT GCC CTG ATC GAT 960
 Thr Gly Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp
 305 310 315 320

TGC CTG GCT CCG GAT CGT CGT GTA GAG ATC GAA GTT AAA GGC TAC AAA 1008
 Cys Leu Ala Pro Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys
 325 330 335

GAA GTT GTA ACT CAG CCG CAG GGC TAA 1035
 Glu Val Val Thr Gln Pro Gln Gly
 340

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) Longueur : 344 acides aminés

(B) Type : acide aminé

(C) Nombre de brins : simple

(D) Configuration : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala
 1 5 10 15

Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly
 20 25 30 35

Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe
 40 45 50

Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu
 55 60 65 70

Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly
 75 80 85 90
 Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr
 95 100 105
 Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser
 110 115 120 125
 Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly
 130 135 140
 Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp
 145 150 155 160
 Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met
 165 170 175 180
 Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg Phe Gly Gln Glu Asp Ala Ala Pro Val Val
 185 190 195
 Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Glu Val Ala Thr Lys His Phe Thr Leu Lys
 200 205 210 215
 Ser Asp Val Leu Phe Asn Phe Asn Lys Ala Thr Leu Lys Pro Glu Gly Gln Gln
 220 225 230
 Ala Leu Asp Gln Leu Tyr Thr Gln Leu Ser Asn Met Asp Pro Lys Asp Gly Ser
 235 240 245 250
 Ala Val Val Leu Gly Tyr Thr Asp Arg Ile Gly Ser Glu Ala Tyr Asn Gln Gln
 255 260 265 270
 Leu Ser Glu Lys Arg Ala Gln Ser Val Val Asp Tyr Leu Val Ala Lys Gly Ile
 275 280 285
 Pro Ala Gly Lys Ile Ser Ala Arg Gly Met Gly Glu Ser Asn Pro Val Thr Gly
 290 295 300 305
 Asn Thr Cys Asp Asn Val Lys Ala Arg Ala Ala Leu Ile Asp Cys Leu Ala Pro
 310 315 320
 Asp Arg Arg Val Glu Ile Glu Val Lys Gly Tyr Lys Glu Val Val Thr Gln Pro
 325 330 335 340
 Gln Gly

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) Longueur : 567 paires de bases
- (B) Type : acide nucléique
- (C) Nombre de brins : simple
- (D) Configuration : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMBLEMENT: 1..567

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

ATG AAA GCA ATT TTC GTA CTG AAT GCG GCT CCG AAA GAT AAC ACC TGG	48
Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp	
1 5 10 15	
TAT GCA GGT GGT AAA CTG GGT TGG TCC CAG TAT CAC GAC ACC GGT TTC	96
Tyr Ala Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe	
20 25 30	
TAC GGT AAC GGT TTC CAG AAC AAC AAC GGT CCG ACC CGT AAC GAT CAG	144
Tyr Gly Asn Gly Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln	
35 40 45	
CTT GGT GCT GGT GCG TTC GGT GGT TAC CAG GTT AAC CCG TAC CTC GGT	192
Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly	
50 55 60	
TTC GAA ATG GGT TAT GAC TGG CTG GGC CGT ATG GCA TAT AAA GGC AGC	240
Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser	
65 70 75 80	
GTT GAC AAC GGT GCT TTC AAA GCT CAG GGC GTT CAG CTG ACC GCT AAA	288
Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly Val Gln Leu Thr Ala Lys	
85 90 95	
CTG GGT TAC CCG ATC ACT GAC GAT CTG GAC ATC TAC ACC CGT CTG GGC	336
Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr Thr Arg Leu Gly	
100 105 110	

GGC ATG GTT TGG CGC GCT GAC TCC AAA GGC AAC TAC GCT TCT ACC GGC	384
Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser Thr Gly	
115 120 125	
GTT TCC CGT AGC GAA CAC GAC ACT GGC GTT TCC CCA GTA TTT GCT GGC	432
Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly	
130 135 140	
GGC GTA GAG TGG GCT GTT ACT CGT GAC ATC GCT ACC CGT CTG GAA TAC	480
Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr	
145 150 155 160	
CAG TGG GTT AAC AAC ATC GGC GAC GCG GGC ACT GTG GGT ACC CGT CCT	528
Gln Trp Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro	
165 170 175	
GAT AAC GGC ATG CTG AGC CTG GGC GTT TCC TAC CGC TAA	567
Asp Asn Gly Met Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg	
180 185	

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) Longueur : 188 acides aminés
- (B) Type : acide aminé
- (C) Nombre de brins : simple
- (D) Configuration : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Ala Pro Lys Asp Asn Thr Trp Tyr Ala	
1 5 10 15	
Gly Gly Lys Leu Gly Trp Ser Gln Tyr His Asp Thr Gly Phe Tyr Gly Asn Gly	
20 25 30 35	
Phe Gln Asn Asn Asn Gly Pro Thr Arg Asn Asp Gln Leu Gly Ala Gly Ala Phe	
40 45 50	
Gly Gly Tyr Gln Val Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Glu Met Gly Tyr Asp Trp Leu	
55 60 65 70	

Gly Arg Met Ala Tyr Lys Gly Ser Val Asp Asn Gly Ala Phe Lys Ala Gln Gly
75 80 85 90

Val Gln Leu Thr Ala Lys Leu Gly Tyr Pro Ile Thr Asp Asp Leu Asp Ile Tyr
95 100 105

Thr Arg Leu Gly Gly Met Val Trp Arg Ala Asp Ser Lys Gly Asn Tyr Ala Ser
110 115 120 125

Thr Gly Val Ser Arg Ser Glu His Asp Thr Gly Val Ser Pro Val Phe Ala Gly
130 135 140

Gly Val Glu Trp Ala Val Thr Arg Asp Ile Ala Thr Arg Leu Glu Tyr Gln Trp
145 150 155 160

Val Asn Asn Ile Gly Asp Ala Gly Thr Val Gly Thr Arg Pro Asp Asn Gly Met
165 170 175 180

Leu Ser Leu Gly Val Ser Tyr Arg
185

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 774 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..774

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ATG AAA GCA ATT TTC GTA CTG AAT GCG CAA CAC GAT GAA GCC GTA GAC 48
Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp
1 5 10 15

GCG AAT TTC GAC CAA TTC AAC AAA TAT GGA GTA AGT GAC TAT TAC AAG 96
Ala Asn Phe Asp Gln Phe Asn Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys
20 25 30

AAT CTA ATC AAC AAT GCC AAA ACT GTT GAA GGC GTA AAA GAC CTT CAA Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln 35 40 45	144
GCA CAA GTT GTT GAA TCA GCG AAG AAA GCG CGT ATT TCA GAA GCA ACA Ala Gln Val Val Glu Ser Ala Lys Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr 50 55 60	192
GAT GGC TTA TCT GAT TTC TTG AAA TCA CAA ACA CCT GCT GAA GAT ACT Asp Gly Leu Ser Asp Phe Leu Lys Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr 65 70 75 80	240
GTT AAA TCA ATT GAA TTA GCT GAA GCT AAA GTC TTA GCT AAC AGA GAA Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu 85 90 95	288
CTT GAC AAA TAT GGA GTA AGT GAC TAT CAC AAG AAC CTA ATC AAC AAT Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr His Lys Asn Leu Ile Asn Asn 100 105 110	336
GCC AAA ACT GTT GAA GGT GTA AAA GAC CTT CAA GCA CAA GTT GTT GAA Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val Val Glu 115 120 125	384
TCA GCG AAG AAA GCG CGT ATT TCA GAA GCA ACA GAT GGC TTA TCT GAT Ser Ala Lys Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp 130 135 140	432
TTC TTG AAA TCA CAA ACA CCT GCT GAA GAT ACT GTT AAA TCA ATT GAA Phe Leu Lys Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu 145 150 155 160	480
TTA GCT GAA GCT AAA GTC TTA GCT AAC AGA GAA CTT GAC AAA TAT GGA Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly 165 170 175	528
GTA AGT GAC TAT TAC AAG AAC CTA ATC AAC AAT GCC AAA ACT GTT GAA Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu 180 185 190	576
GGT GTA AAA GCA CTG ATA GAT GAA ATT TTA GCT GCA TTA CCT AAG ACT Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Thr 195 200 205	624
GAC ACT TAC AAA TTA ATC CTT AAT GGT AAA ACA TTG AAA GGC GAA ACA Asp Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr 210 215 220	672

ACT ACT GAA GCT GTT GAT GCT GCT ACT GCA AGA TCT TTC AAT TTC CCT 720
 Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Arg Ser Phe Asn Phe Pro
 225 230 235 240

ATC CTC GAG AAT TCC CGG GGA TCC GTC GAC CTG CAG CCA AGC TTA AGT 768
 Ile Leu Glu Asn Ser Arg Gly Ser Val Asp Leu Gln Pro Ser Leu Ser
 245 250 255

AAG TAA
 Lys

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 257 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Asn Ala Gln His Asp Glu Ala Val Asp Ala Asn
 1 5 10 15

Phe Asp Gln Phe Asn Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn
 20 25 30 35

Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val Val Glu Ser
 40 45 50

Ala Lys Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp Phe Leu Lys
 55 60 65 70

Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys
 75 80 85 90

Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr His Lys Asn
 95 100 105

Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val
 110 115 120 125

Val Glu Ser Ala Lys Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp
 130 135 140
 Phe Leu Lys Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala
 145 150 155 160
 Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr
 165 170 175 180
 Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile
 185 190 195
 Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Thr Asp Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn
 200 205 210 215
 Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala
 220 225 230
 Arg Ser Phe Asn Phe Pro Ile Leu Glu Asn Ser Arg Gly Ser Val Asp Leu Gln
 235 240 245 250
 Pro Ser Leu Ser Lys
 255

REVENDICATIONS

1. Complexe immunogène, caractérisé en ce qu'il consiste en au moins un épitope oligo- ou polysaccharidique naturellement présent dans des bactéries, couplé à une protéine porteuse choisie parmi la protéine de liaison à la sérumalbumine humaine du Streptocoque, les protéines de membrane externe de bactérie gram négatif, ou leurs fragments.

2. Complexe immunogène selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'épitope oligo- ou polysaccharidique est susceptible d'être obtenu à partir de bactéries, gram négatif ou gram positif.

3. Complexe immunogène selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'épitope oligo- ou polysaccharidique est choisi parmi les oligosaccharides susceptibles d'être obtenus à partir de lipopolysaccharides de membrane et les oligosaccharides de capsule, de bactéries du genre Salmonella, Escherichia, Neisseria, Shigella, Haemophilus ou Klebsiella.

4. Complexe immunogène selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un oligosaccharide substantiellement purifié, susceptible d'être obtenu à partir de lipopolysaccharides de membrane de bactéries du genre Salmonella.

5. Complexe immunogène selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'oligosaccharide peut être obtenu à partir d'une bactérie du genre Salmonella appartenant à un sérotype porteur d'une spécificité antigénique choisie dans le groupe suivant : O:1, O:2, O:4, O:6, 7, 8, O:3 et O:9.

6. Complexe immunogène selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il contient un oligosaccharide susceptible d'être obtenu à partir du lipopolysaccharide de Salmonella enteritidis de spécificité antigénique O:9.

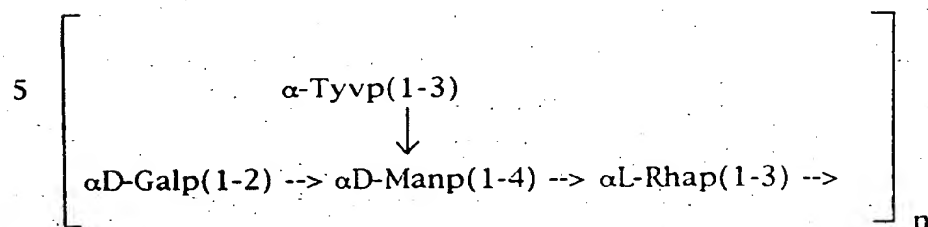
7. Complexe immunogène selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une unité :

α D galactose p(1-2)- α D mannose p(1-4)- α L Rhamnose p(1-3)

35

α xylose p(1-3)

8. Complexe immunogène selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un oligosaccharide de formule



10 dans laquelle Gal représente le galactose
Man représente le mannose
Rha représente le rhamnose
Tyv représente le tyvélose

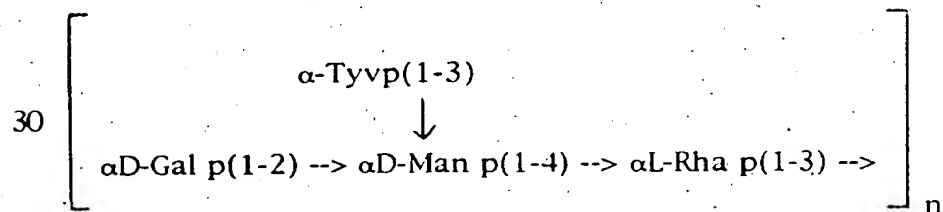
et n peut varier entre 1 et 24.

15 9. Complexe immunogène selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la protéine porteuse comporte au moins une partie d'une protéine de type OmpA de bactéries gram négatif.

20 10. Complexe immunogène selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la protéine porteuse comporte au moins une partie d'une protéine de membrane externe de *Klebsiella pneumoniae*.

25 11. Complexe immunogène selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la protéine porteuse présente
a) la seq ID n° 2, ID n° 4 ou ID n° 6, ou
b) une séquence présentant au moins 80% d'homologie avec l'une des séquences mentionnées en a).

12. Complexe immunogène, caractérisé en ce qu'il est constitué d'au moins un oligosaccharide de formule



dans laquelle Gal représente le galactose
Man représente le mannose
Rha représente le rhamnose
Tyv représente le tyvélose

- 5 et n peut varier entre 1 et 5,
couplé avec une protéine présentant l'une des séquences ID n° 2, ID n° 4,
ID n° 6, ou ID n° 8, ou possédant au moins 80% de similarité avec l'une des
séquences ID n° 2, ID n° 4 ou ID n° 6 ou ID n° 8.

- 10 13. Complexe immunogène selon l'une des revendications 1 à 3,
caractérisé en ce qu'il comprend au moins un antigène capsulaire de
Salmonella.

14. Utilisation d'un complexe immunogène selon l'une des
revendications 1 à 13, pour la préparation d'un vaccin.

- 15 15. Utilisation d'un complexe selon la revendication 12, pour la
préparation d'un vaccin destiné à protéger un animal contre les
infections provoquées par les bactéries Salmonella appartenant au
sérogroupe antigénique O:9.

- 20 16. Vaccin caractérisé en ce qu'il comprend un complexe
immunogène selon l'une des revendications 1 à 12 et en ce qu'il comprend
en outre un antigène capsulaire de Salmonella.

17. Procédé de préparation d'un complexe immunogène selon l'une
des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que :

- a) on isole des oligosaccharides de Salmonella à partir des
lipopolysaccharides de membrane,
25 b) de manière facultative, on purifie les oligosaccharides de manière à
conserver des oligosaccharides de même poids moléculaire,
c) les oligosaccharides sont activés chimiquement,
d) les oligosaccharides activés sont couplés à une protéine porteuse pour
former le complexe immunogène.

- 30 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la
protéine porteuse est activée avant l'étape d) par une méthode chimique
pour faciliter le couplage.

19. Procédé selon l'une des revendications 17 ou 18, caractérisé en ce qu'on effectue ensuite une étape supplémentaire consistant à coupler le complexe obtenu à l'issue de l'étape d) avec un autre déterminant antigénique de Salmonella.

- 5 20. Utilisation d'une protéine présentant l'une des séquences ID n° 2, 4, 6 ou 8 pour améliorer l'immunogénicité d'un oligosaccharide.

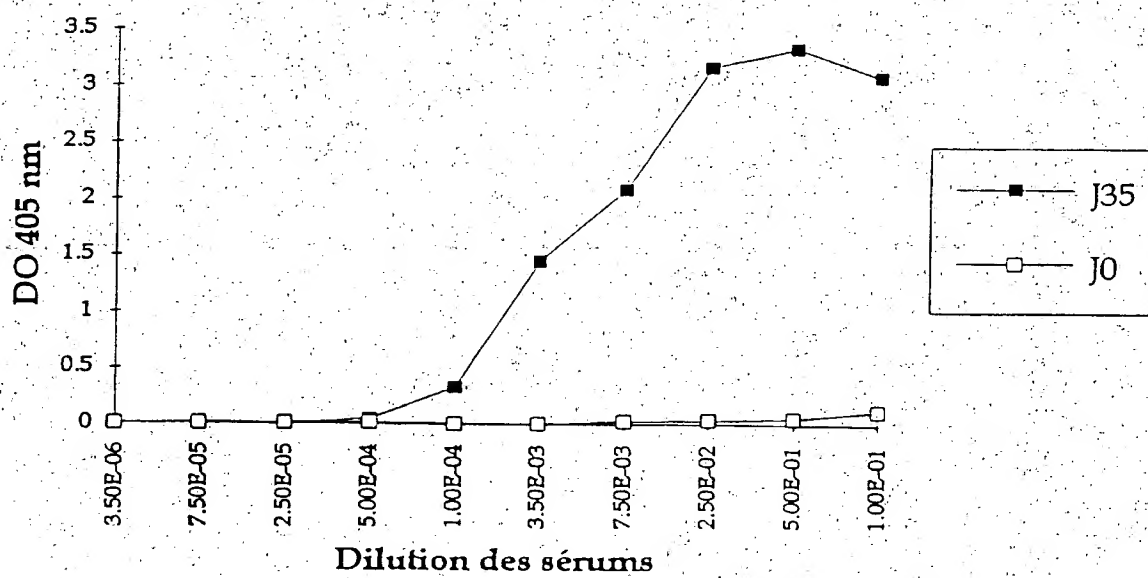


Figure 1

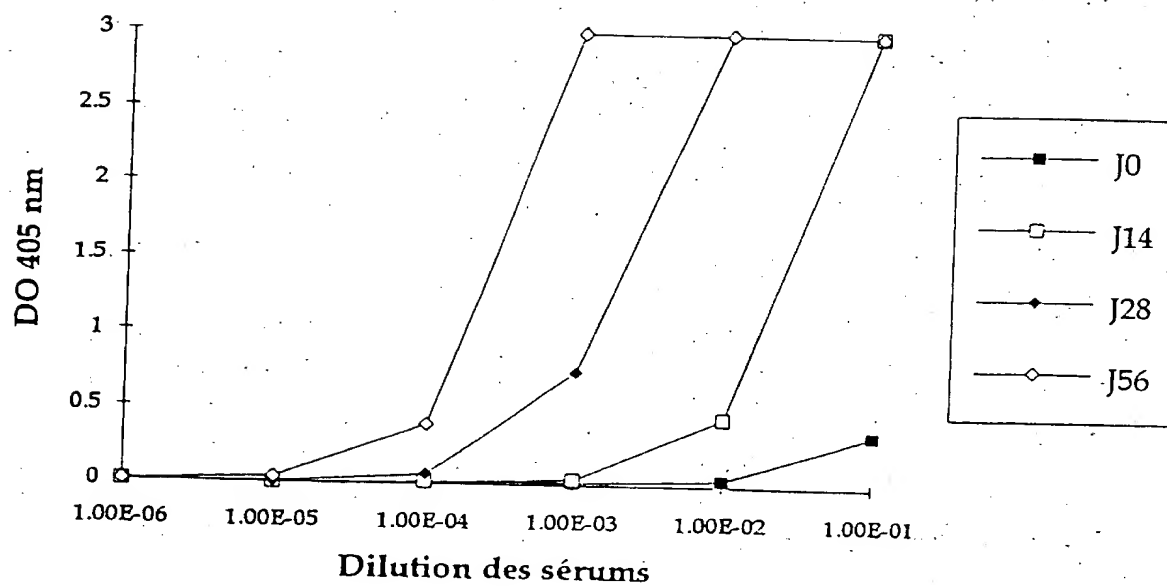


Figure 2

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2748476

N° d'enregistrement
national

FA 529440

FR 9605692

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DATABASE BIOSIS BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US ABREGE 95, 78496, CHATURVEDI ET AL: "IMMUNE RESPONSE OF RABBITS IMMUNIZED WITH OUTER MEMBRANE PROTEINS (PORINS) OF SALMONELLA DUBLIN 51" XP002024838 * abrégé * & INDIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES 64 (12).1994.1308-1315, ---	1-3,14
D,A	INFECTION AND IMMUNITY, vol. 58, 1990, pages 1691-1696, XP002024834 PUOHINIEMI ET AL: "A STRONG ANTIBODY RESPONSE TO THE PERIPLASMIC C-TERMINAL DOMAIN OF THE OMPA PROTEIN OF ESCHERICHIA COLI IS PRODUCED BY IMMUNIZATION WITH PURIFIED OMPA OR WITH WHOLE E.COLI OR SALMONELLA TYPHIMURIUM BACTERIA" * le document en entier *	
A	WO 95 27787 A (PF MEDICAMENT ;BINZ HANS (FR); GUYEN NGOC THIEN N (FR); BAUSSANT T) 19 Octobre 1995 * page 5, ligne 25 - page 9, ligne 18 *	
A	WO 93 07178 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC) 15 Avril 1993 * page 6, ligne 22 - page 8, ligne 14 * * page 10, ligne 1 - ligne 11 * --- -/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
10 Février 1997		Sitch, W
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

